



TITLE:

マイトマイシンCによる癌転移増強作用

AUTHOR(S):

村沢, 賢一

CITATION:

村沢, 賢一. マイトマイシンCによる癌転移増強作用. 日本外科宝函
1983, 52(5): 670-679

ISSUE DATE:

1983-09-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/208884>

RIGHT:

マイトマイシンCによる癌転移増強作用

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

村 沢 賢 一

〔原稿受付・昭和58年7月12日〕

Enhancing Effect of Mitomycin C on Hematogeneous Metastases of Ascites Hepatoma in Rat

KEN-ICHI MURASAWA

The 2nd department of surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Pro. Dr. YORINORI HIKASA)

The function of the Mitomycin C(MMC) is akin to that of alkylating agents which Cyclophosphamide belongs to.

There are some reports related to the metastatic enhancing effect of Cyclophosphamide when the drug was given prior to cell inoculation.

The author presents that MMC can also evoke the metastatic enhancing effect with the following experiment and surveillance.

Ascites hepatoma cells (A1113C) from a rat, 99% free cells resistant to MMC numbering $10^4 \sim 10^5$, were inoculated into the mesenteric vein of Donryu rats. Prior to this, MMC($100 \sim 800 \mu\text{g/kg}$) was administered to the rat (ip, iv or into the mesenteric vein). Three or four weeks after the cell inoculation, all the rats were sacrificed and the metastatic colonies on the surface of each rat's lung and liver were counted.

1) Rats which had an inoculation of 10^4 cells: there was no colony formation on the liver. But on the surface of the lung, metastatic colonies were observed. The metastatic enhancing effect of MMC was confirmed when the dose of MMC exceeded more than $300 \mu\text{g/kg}$ body weight. The degree of enhancement was related to the dose of MMC.

2) Rats which had an inoculation of 10^5 cells: The colonies formed on the lungs were too many to be counted. The degree of colony formation on the liver was enhanced in the group that received pretreatment with $400 \text{ g/kg b.w. MMC}$.

3) The enhancing effect in the group treated with the drug 24 hours before the cell inoculation was more remarkable than that in the group treated with the drug immediately before.

Key words: Mitomycin C, Metastatic enhancement, Ascites hepatoma, Hematogeneous metastases.

索引語：マイトマイシンC，転移増強，腹水癌，血行転移。

Present address: The Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

緒 言

癌に対する治療の中で、放射線療法、化学療法が、大きな武器であることは、今更言うまでもない。ところが治療効果を期待して行なった処置が、かえって癌の増殖、転移を促す現象のあることが知られるようになり^{1,2,3,6,17,19,20,21,26,30,34,35,36)}、多くの報告が行なわれた。抗癌剤については、サイクロフォスファミド(以下CPと略す)の大量投与後に転移が著明に増強したという詳細な報告がある^{6,26)}。

マイトマイシンC(以下MMCと略す)は、日常使われる抗癌剤の中で使用頻度が高く、その作用機序は、CPの属するナイトロゲンマスタード系薬剤と類似しているといわれている^{16,33)}。そこで、人に於ける通常使用量相当のMMCが転移増強作用を示しうるかどうかが、検討した。

実験材料と手技

実験動物：静岡県実験動物共同組合より購入したドンリュウラット(雌雄、150～200 gr)を使用した。

腫瘍細胞：東北大学抗酸菌研究所肺癌部門より提供を受けたラット腹水癌 AH13Cを使用した。AH13Cは、99%以上が遊離の単細胞で酵素処理の必要なしに正確な計数が可能である。またAH13Cは、MMCに対して耐性を持った細胞である。代々ラット腹腔内で継代した。実験当日にリン酸緩衝液(PBS)20 mlを腹腔へ穿刺注入し、軽く腹壁をマッサージし、再度、腹腔穿刺を行ない細胞浮遊液として取り出した。1000回転5分間の遠心操作によりPBSで3回洗浄した。トリパンブルーテストにより生細胞数を数えてイーグルのMEM溶液に浮遊させた。1回の注入量は0.5 mlとして細胞数を調整した。

細胞の注入：ラットにペントバルビタールソーダ(ネプタール®)40 mg/kgの腹腔内投与にて麻酔した。開腹して盲腸付近の腸間膜静脈を穿刺し細胞浮遊液を注入した。注入後約2分間局所の用指圧迫にて止血した。その後、乾燥綿花にて注入部位を清拭し、細胞の腹腔内散布を防止した。

MMCの調整と注入：MMCは生理食塩水に溶解し注入液とした。投与量は、0.5 mlとし尾静脈より注入(iv)、或は、腸間膜静脈よりの注入(ipv)を行なった。24時間前投与の場合は、腹腔内投与(ip)を行なった。

MMCの1回投与量は、100 μ g～800 μ g/kgとした。(臨床的に使われるMMCの1回投与量は2 mgから最大40 mgであると思われる。体重50 kgの人を標準とすると、1回投与量5 mgとして100 μ g/kg、1回投与量40 mgとして800 μ g/kgである。これを投与算定の根拠とした。)

CPの調整と注入：生理食塩水に溶解し20 mg/kgの量をiv、ipv、ipの経路で投与した(注入量0.5 ml)。

転移形成と評価：癌細胞 10^6 コ注入群は18日後、 10^3 、 10^4 コ注入群は、30日後に開胸開腹して肝肺表面の転移結節数を算定した。癒合結節については、算定が困難であり比較対照から除外した。 10^6 コ注入群は死亡時に検査した。

実験と結果

〔実験1〕

ラット16匹を4匹ずつ4群(I～IV)に分け、AH13Cを腸間膜静脈に注入した。

注入細胞数：I 10^6 コ、II 10^5 コ、III 10^4 コ、IV 10^3 コ
結果

10^3 コでは、肝肺ともに転移がみとめられなかった。 10^4 コで肺にわずかの転移結節をみとめ(1 ± 1) 10^5 コ

表1 AH13Cをラット腸間膜静脈より注入後の生存日数と剖検所見

注入細胞数	生存日数	胸腔、腹腔	転移	平均生存日数
10^6	5日, 5日, 7日, 10日	血性胸水, 腹水	結節(—)	7日
10^5	22日, 17日, 14日, 19日	一部にみとめる	肺結節(++) 肝結節(±)	18日
10^4	30日以降も生存	みとめない	肺結節(±) 肝結節(—)	
10^3				30～35日で屠殺剖検

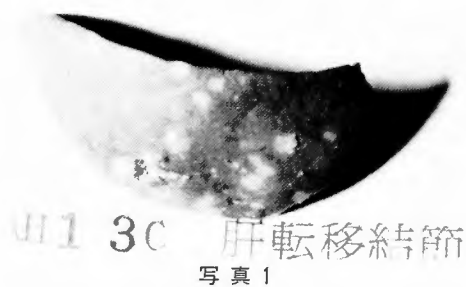


写真1



写真2

では、肺に多数(419 ± 99.5), 肝では、極く少数 (1.9 ± 0.6) の転移結節が出来ていた。 10^6 コでは、それぞれ5~10日目に死亡し、血性腹胸水がみとめられたが、肝肺の結節形成は、みとめられなかった。(表1)(写真1, 2, 3, 4)



写真3 肝転移結節

〔実験2〕

I. 10^4 コの細胞を腸間膜静脈へ注入する.

a 細胞のみ注入する.

- ① 直前に生食水 0.5 ml (ipv) ($n=5$)
- ② 24時間前に生食水 0.5 ml (ip) ($n=5$)

b 細胞注入の24時間前に、MMC を投与する.

(i) MMC (ip)

- ① $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)
- ② $800 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

(ii) MMC (iv)

- ① $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)
- ② $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)
- ③ $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)
- ④ $600 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)



写真4 肝転移結節 (×360)

⑤ 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

c 直前に MMC を投与する.

MMC (iv) 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

II. 10^5 コの細胞を腸間膜静脈へ注入する.

a 細胞のみ注入する.

① 直前に生食水 0.5 ml (ipv) ($n=5$)

② 24時間前に生食水 (ip) ($n=5$)

b 細胞注入の24時間前に, MMC を投与する.

(i) MMC (iv) 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

(ii) MMC (ip) 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

c 直前に MMC を投与する.

(i) MMC (iv) 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

(ii) MMC (ipv)

① 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$) ② 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=5$)

d 24時間前に CP (20 mg/kg) を投与する.

(ip) ($n=5$)

e 直前に CP (20 mg/kg) を投与する.

(ipv) ($n=5$)

表2 AH13C 10^4 コをラット腸間膜静脈より注入後の肺転移結節数. MMC を尾静脈又は腹腔より前投与している.

MMC 投与経路	MMC 投与時期	MMC 投与量	ラット 匹数	平均肺転移 結節数 \pm S. E.
iv	24時間前	生理食塩水 0.5 ml	5	1 \pm 1
iv	24時間前	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	5 \pm 4.02
//	//	300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	93.6 \pm 25.9
//	//	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	182 \pm 48.2
//	//	600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	280 \pm 51.5
//	//	800 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	304 \pm 78.9
ip	24時間前	生理食塩水 0.5 ml	5	0
ip	24時間前	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	172 \pm 45.3
	//	800 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	444 \pm 77.5
iv	直前	生理食塩水 0.5 ml	5	0
iv	直前	400 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5	62.5 \pm 19.7

iv : ラット尾静脈より注入

ip : ラット腹腔へ注入

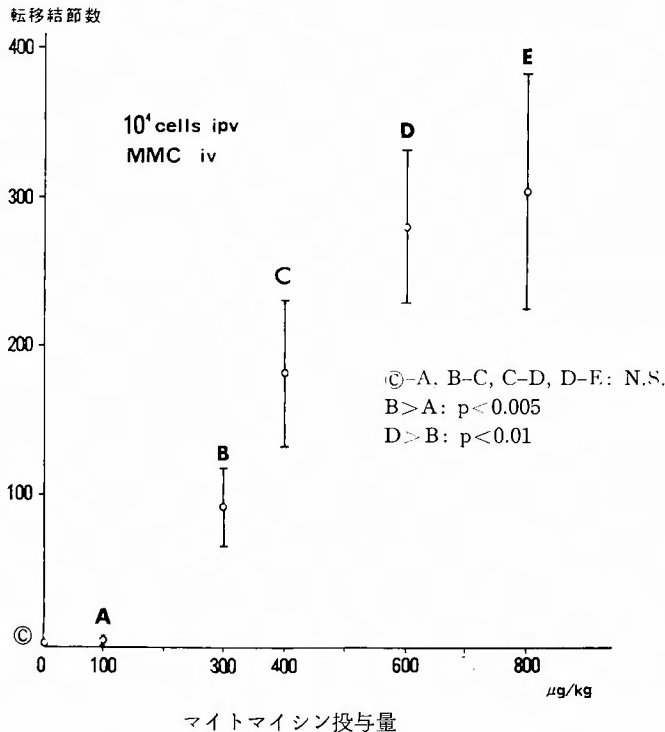


図1 腫瘍細胞 10^4 コをラット腸間膜静脈より注入した場合の肺転移結節数の MMC による増強作用.

MMC は尾静脈から24時間前に A: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B: 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, C: 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D: 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, E: 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を注入. ◎: コントロール

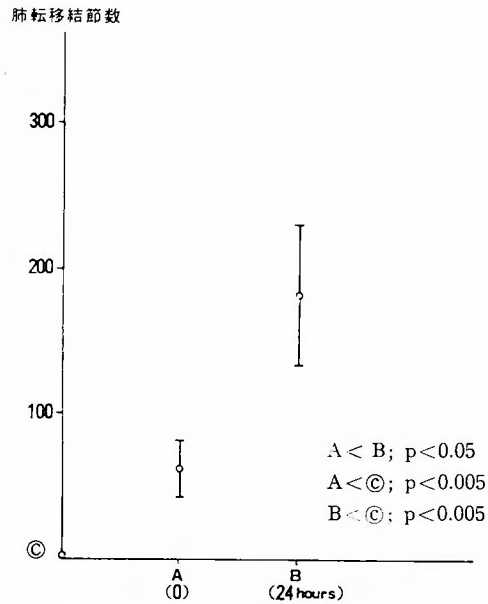


図2 腫瘍細胞 10⁴コのラット腸間膜静脈への注入と MMC 投与との時間間隔と肺転移結節数。
A: MMC 400 µg/kg を細胞注入の直前に尾静脈より投与. B: MMC 400 µg/kg を細胞注入の24時間前に投与. ©: コントロール

結果:

I. 10⁴コの細胞注入による肺転移については, MMC 投与により転移結節数が増加した. ($p < 0.001$). 投与量と結節数の関係は, 表 2, 図 1 に示した.

MMC の直前投与と24時間前投与では, 24時間前投与で転移結節数が, より大であった ($p < 0.05$) (図 2) 24時間前の 400 µg/kg, 800 µg/kg の MMC 投与で iv, ip それぞれの経路による結節数の差は, みとめられなかった.

いずれも 10⁴コの細胞注入による肝転移は, みとめられなかった.

II-a, b, c コントロール群が既に肺に多数の転移をつくっていた. MMC 前投与群では, 転移結節数は, 更に増加の傾向があったが結節が互いに融合して個数算定による比較は, できなかった. よって実験 II では, 肝転移についてのみ算定し比較を行なった.

100 µg/kg の MMC 投与 (直前) では, コントロール群と有意の差は, みとめられなかった.

表 3 AH13C 10⁵コをラット腸間膜静脈より注入後の肝転移結節数. MMC を腸間膜静脈又は腹腔へ前投与している.

MMC 投与経路	MMC 投与時間	MMC 投与量	ラット数	平均肝転移結節数±S.E.	平均肺転移結節数±S.E.
ip	24時間前	生理食塩水 0.5 ml	5	1.9±0.6	419±99.5
ip	24時間前	400 µg/kg	5	225±59.6	*
ipv	直前	生理食塩水 0.5 ml	7	0	320±77.4
	直前	100 µg/kg	5	0.75±0.7	*
	//	400 µg/kg	5	117±53.6	*

* 多数で算定できない.

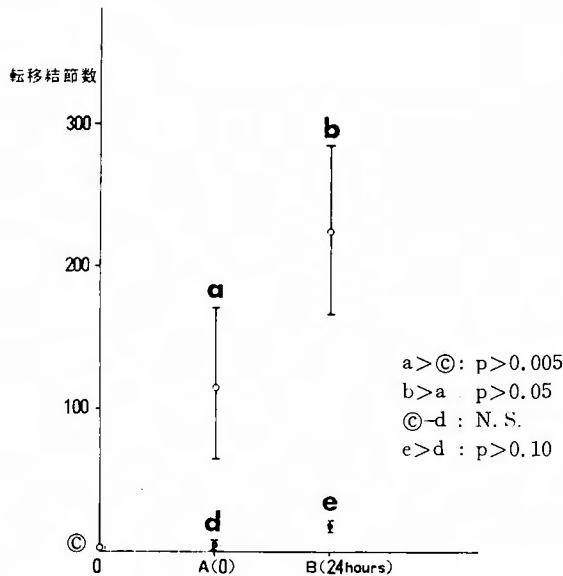


図3 腫瘍細胞 10^5 コをラット腸間膜静脈より注入した場合の肝転移結節数。
a: MMC 400 μ g/kg を細胞注入の直前に投与. b: MMC 400 μ g/kg を24時間前に投与. d: CP 20 mg/kg を直前投与. e: CP 20 mg/kg を24時間前に投与. C: コントロール

400 μ g/kg 投与(直前, 24時間前)では, 肝転移結節数の著明な増加がみとめられた。

MMC 直前投与と24時間投与を比較すると, 24時間前投与の方が転移結節数が多かった ($p < 0.10$). (表3) (図3)

II-d, e. CP 投与でわずかに肝転移結節数が増加していた ($p < 0.005$). 又, 24時間前投与の方が, 直前投与よりも肝転移結節数が多かった ($p < 0.01$). (表4) (図3)

〔実験3〕

低濃度 MMC 処理細胞の注入。

腹腔より採取した細胞を PBS で3回洗浄した後, 20%牛胎児血清を加えた MEM 液に浮遊した。これに MMC を 1 μ g/ml となるように加えて 37°C 30分

表4 AH13C 10^5 コをラット腸間膜静脈より注入後の肝転移結節. CP を腸間膜静脈又は腹腔へ前投与している。

CP 投与経路	CP 投与時期	CP 投与量	ラット 匹数	平均肝転移 結節数 \pm S.E.
ip	24時間前	20mg/kg	5	9.25 \pm 3.7
ipv	直前	20mg/kg	5	2.2 \pm 1.9

間, 5% CO_2 インキュベーター内にて静置した。PBS で2回洗浄した後 MEM に浮遊させ 10^5 コ/0.5 ml を腸間膜静脈より注入した。 ($n=4$)

結果。

肝転移結節数は, コントロール群 (実験 II a ~ ①) と差は, なかった。 (1.5 ± 1.2)

〔実験4〕

細胞培養と再移植

肝転移結節と肺転移結節を, それぞれ無菌的に採取した。コラーゲナーゼ 1 mg/ml (Worthington-I) にて15分間処理し細胞浮遊液とした。2回洗浄後, 5% CO_2 インキュベーター (37°C) 内で, 20%牛胎児血清添加 MEM により培養した。再増殖した細胞の 2×10^6 コを, ラット腹腔へ投与して, 生存日数を観察した。(A 肺転移結節: $n=2$ B 肝転移結節: $n=2$)

結果:

A それぞれ5日, 6日目に癌死した。

B とともに6日目に癌死した。

〔実験5〕

腹腔内より採取した AH13C と転移結節により培養した AH13C とを透過電子顕微鏡にて比較した。

結果:

核は, 不整形で, クロマチンに富んでいる。細胞質

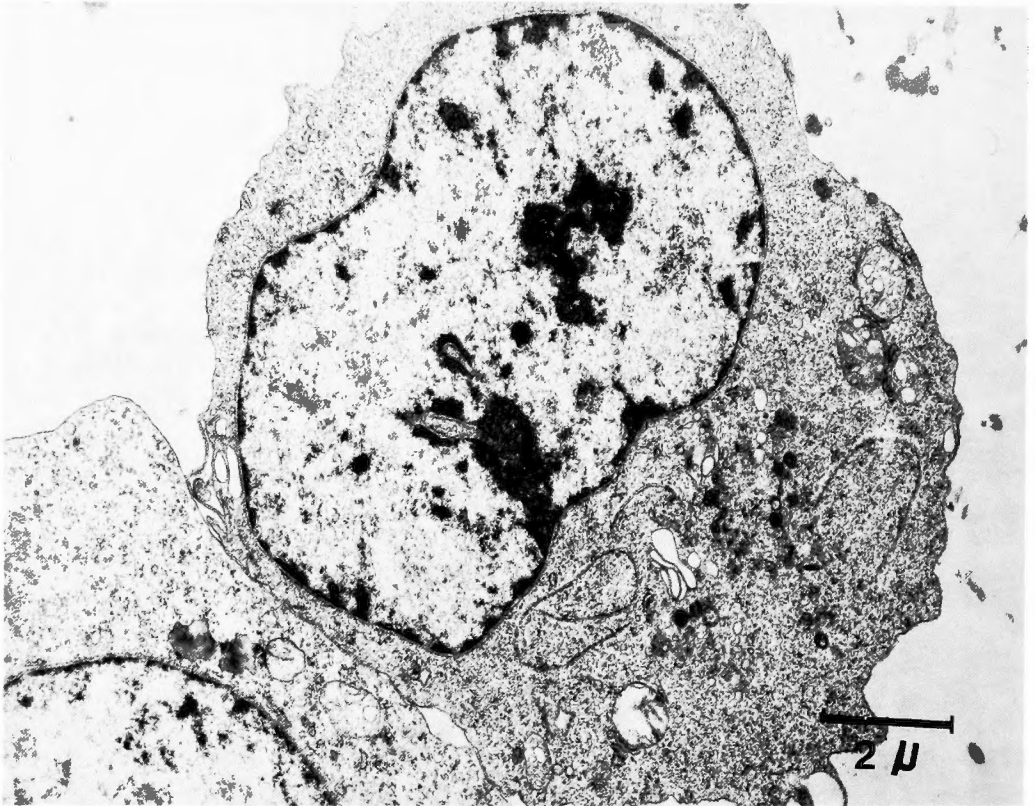


写真5 AH13C の電子顕微鏡像

内には、滑面小胞体が少ない。又、ミトコンドリアも少数認められる。

比較電顕像で差は、みとめられなかった(写真5)。(広野による観察参照)¹³⁾

考 察

著者は、抗癌剤マイトマイシンC (MMC) の大量ワンショット投与の時にみられる転移増強作用が、血管壁の障害にもとづくものであると想定した。

今回の実験では、癌細胞をラット門脈内に注入して、肺、肝に於ける転移結節数が、MMC の投与によって増加しうを示したものである。

AH13C は、広野¹²⁾ により MMC に対して耐性を付与されたラット腹水癌である。時と共に耐性は、次第に低下するが、数ヶ月で安定期に入り、かなりの抵抗性を長期間維持すると言われている¹⁷⁾。MMC 耐性である為 MMC 投与直後に細胞を注入 (iv, ipv) としても、腫瘍細胞は障害を受けにくく、生体側へのみ MMC による障害が起こることが予想される。

又、AH13C は、ほぼ100%近く自由細胞 (free cell) として存在し、細胞数の算定に好都合である上に、1個の細胞の血管壁への付着、侵入ということで転移を推し測る上でも便利である。これが AH13C を、本実験に用いた理由である。

又、AH13C は、尾静脈より注入して肺、脳転移を形成した場合、ほとんどが実質でなく、表層に転移を形成するという³¹⁾。本実験に於て腸間膜静脈より注入した場合の肝転移結節も80%以上が、肝表面に形成されていた。従って肺・肝表面での算定された転移結節は、転移の程度をほぼよく表わすと考えられる。

AH13 の LD50 は、ip の場合は、細胞10コ以下である¹²⁾。また iv では、10⁴コで²⁸⁾あるという。腫瘍細胞を血流中へ投与 (iv) した場合、その99.7%は、変性消失する²⁴⁾。20万個の B₁₆ melanoma cell を注入14日後には、400コ (0.2%) の細胞しか生きていないという報告もある¹⁰⁾。従って肺肝等に転移結節を生ずるには、10⁴~10⁵コ以上の腫瘍細胞が血流中へ注入されることが必要だろうと考えられる。現実の転移で、こ

のような多数の細胞が血管の中を流れるものであろうか。間島²³⁾は、胃切除術に於て、胃よりの流出静脈から $10^6 \sim 10^7$ コ/mlの癌細胞を検出した例を報告しており、Butler⁵⁾は、マウス乳癌で1gの癌は、24時間で 3.2×10^5 コの細胞を放出しているとしている。Sandberg²⁷⁾は、105人の進行癌の患者の末梢血を検索し45人に癌細胞を認めている。従って 10^4 コ、 10^5 コの癌細胞が血中を流れることは、それほど稀なことではないと思われる。更に中村²⁵⁾は、AH13を用いて、 10^6 コ/mlの細胞浮遊液を調整して臓器灌流を行なった。癌細胞の通過し易さは、両下肢90%>腎(40%)>肝(10~20%)>肺(1~3%)の順であるという。本実験では、腫瘍細胞は全て門脈経由で注入された。転移形成のつくり易さは、肺>肝であり、脳、脾、腎では、転移形成は認められなかった(10^5 コ、 10^4 コ注入)。 10^3 コ注入では、観察期間の範囲内で肺にも転移が認められなかったのである。

薬剤又は、放射線などの前処理によって、腫瘍細胞経静脈内注入後の肝・肺転移が増強したという報告は、極めて数多く認められる(放射線^{2,3,18,35)}ハイドロコチゾン¹⁷⁾、高温療法³⁴⁾、ヘパリンの少量投与⁷⁾、サイクロフォスファミド^{6,26)}、アクチノマイシンD⁶⁾、Mithramycin⁶⁾、HN₂²⁹⁾、四塩化炭素¹⁾、ヒスタミン³⁰⁾、高脂質食餌¹⁾、ガラス片¹⁾、エンドトキシン³⁶⁾)。通常は、転移ができにくい臓器でも腫瘍細胞が着床しやすいような障害を与えれば転移が多く発生することも報告されている(ガラス片:腎、腸間膜¹⁾。プラジキニン:脳²⁸⁾。外傷、異物:大腿筋、脳、皮下¹⁾)。

本実験に於ては、MMCの前処置により、肝・肺、に癌細胞の着床を促すような状態が生じ得ることが示されたわけである。

本実験に用いたMMCワンショット投与量は、100 μ g/kg~800 μ g/kgである。転移増強作用は、300 μ g/kgからみとめられている。これは、臨床的には、15 mg~20 mg以上のMMCをワンショットで投与した場合に相当する。

又、MMC投与経路は、経門脈的、経末梢静脈的の2通りを用いようと思図したが、腹腔内投与は、大部分が腹膜から門脈、肝を経由して迅速に吸収されると考えられるので²²⁾、経門脈的24時間前投与の場合は、腹腔内投与を用いることとした。経門脈的投与と末梢静脈的投与によって肺転移形成に差はみとめられなかった。

以上のような転移増強の発生機序については、1. 血管内皮細胞障害により癌細胞の血管壁への付着を容

易にする³⁾。2. 凝固系に作用し、癌細胞の血管壁付着後のフィブリン、血小板凝集形成を促進してこれを被覆する。これは、免疫系からの攻撃に対し保護的に働らくか、或は、粘着剤として癌細胞の流れ出しを阻止する^{4,9,11,14,15,29,32)}。3. 癌細胞へ直接働らいて、癌細胞の増殖性を高める²¹⁾。4. 生体側の免疫抑制作用などが考えられている。

Brown³⁾は、肺及び全身に照射を行なったラットでそれぞれの間で腫瘍転移増強作用に差が無いことを観察し、免疫系に関係なく転移増強作用が起り得ることを示した。Putten²⁶⁾は、CPの転移増強作用が、ワーファリンによって阻止できないことにより、凝固系の関与なしでも転移増強作用が得ることを明らかにした。又、Carmel⁶⁾は、CPによる肺転移増強作用が、免疫系、凝固系のいずれにもよらないと述べている。尚、MMCは、癌細胞を賦活し、増殖を促すということについては、著者の実験では、みとめられていない。

Eddy⁸⁾は、転移増強作用の機序について、放射線照射後の微少循環の観察を行なった。照射後24~30時間で浮腫を生じ、血流の低下、局所出血をみとめ、局所炎症による血流停滞や内皮細胞障害が転移増強に大きな役割を占めていると述べている。

薬剤、X線などの前処理と転移最大増強作用発現とは、時間的なズレがある。放射線照射で12時間³⁾、24時間³⁵⁾、4日²⁾、サイクロフォスファミドで24時間⁶⁾、と報告されている。本実験でも直前投与より24時間前にCP、MMCを投与した方が転移増強作用が大きかった。この時期は、炎症の程度が極大に達する時期と考えられ、局所炎症が大きな要因であることを示している。このような免疫系、凝固系の変化より薬剤の局所血管床への作用、とくに、それによる局所炎症が、転移増強作用の機転として重要なものであると考えられる。しかし、この血管壁へのMMCの作用は、直接作用でなく、白血球の存在下に発現することをみとめている(unpublished data)。この点については第2報で報告する。

結 語

MMC耐性AH13Cというラット自由細胞型腹水癌 10^4 、 10^5 コをラットの腸間膜静脈より注入して肺、肝の結節形成を計数することにより、転移の程度を推し測ろうとした。

この実験系で、MMC 300 μ g/kg以上の直前又は、24時間前ワンショット投与で、転移はあきらかに増強

していた ($p < 0.01$). 又, MMC の24時間前投与で増強作用が強かった。

本研究は京都大学医学部外科学教室第二講座日笠頼則教授の御指導によるものであり、深甚の感謝を捧げる。

貴重な細胞の御提供と併せて懇篤な御助言をいただいた東北大学医学部抗酸菌研究所肺癌部門佐藤春郎教授の御厚情に応えるすべをしらない。

また、京都大学医学部外科学教室第二講座熊田 馨講師の終始かわらぬ御協力はわすれられない。

文 献

- Agostino D: Organ localization and the effect of trauma on the fate of circulating cancer cells. *Cancer Res* **25**: 1728-1732, 1965.
- Brenk HAS: Potentiating effect of prior local irradiation of the lungs on pulmonary metastases. *Brit J Rad* **47**: 332-336, 1974.
- Brown JM: The effect of lung irradiation on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Br J Rad* **46**: 613-618, 1973.
- Brown JM: A study of the mechanism by which anticoulatgaion with warfarin inhibits blood borne metastases. *Cancer Res* **33**: 1217-1224, 1973.
- Butler TP: Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* **35**: 512-516, 1975.
- Carmel RT: The effect of Cyclophosphamide and other drugs on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Cancer Res* **37**: 145-151, 1977.
- Chan S: Metastases enhancing effect of heparin and relationship to a lipoprotein factor. *JNCI* **64**: 1121-1125, 1980.
- Eddy HA: Tumor-vascular responses following irradiation. *Microvascular Res* **20**: 195-211, 1980.
- Elias EG: Heparin and chemotherapy in the management of inoperable lung carcinoma. *Cancer* **36**: 129-136, 1975.
- Fidler IJ: Metastases: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with ^{125}I -5-Iodlo-2'-dexyuridine. *JNCI* **45**: 773-782, 1970.
- Gasic GJ: Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer* **11**: 704-718, 1973.
- Hirono I: Mechanism of natural and required resistance to methyl-bis (β -chloroethyl)-amine N oxide. *Giann* **52**: 39-48, 1961.
- Hirono I: A comparative electron microscopic study on two strains of ascites tumor cells and their sublines resistant to anticancer agents. *Cancer Res* **22**: 282-285, 1962.
- Honn KV: Prostacyclin: A potent antimetastatic agent. *Science* **212**: 1270-1272, 1981.
- Hoover HC: Improved survival with anticoagulation and amputation. *Cancer* **41**: 2475-2480, 1978.
- Iyer VN: A molecular mechanism of Mitomycin action: linking of complementary DNA synthesis. *Pro NAS* **50**: 355-362, 1963.
- Kodama M: Enhancing effects of hydrocortisone on hematogeneous metastases of Ehrlich ascites tumor in mice. *Cancer Res* **35**: 1015-1021, 1975.
- Koike A: The fate of Ehrlich cells injected into the portal system. *Cancer* **16**: 716-720, 1963.
- Kondo T: The limitations and adverse effects of cancer chemotherapy. *Surg Forum* **9**: 607-611, 1958.
- Kondo T: Effects of Nitrogen mustard N oxide, Xrays, and cortisone on Yoshida sarcoma metastasis development. *PSEBM* 384-386, 1959.
- Kondo T: Production of metastases by treatment with carcinostatic agnts. *Nagoya J med sci* **36**: 1-10, 1973.
- Lukas G: The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *J Pharmacol Exp Ther* **178**: 562-566, 1971.
- Majima S: Remote result of stomach resection in stomach cancer cells with positive cancer cells in regional blood. *Tohoku J Exp Med* **84**: 65-71, 1964.
- 宗像秀夫: 腸癌転移の研究, 血中癌細胞の転帰に関する研究. *福島医誌* **11**: 1281-1285, 1961.
- 中村久也: 癌転移を規制する諸因子の実験的吟味. *日本癌床*. (第24回日本癌学会総会シンポジウム) **24**: 615, 1966.
- Putten LM: Enhancement by drugs of metastatic lung nodule formation after intravenous tumor cell injection. *Int J Cancer* **15**: 588-595, 1975.
- Sandberg AA: Examination of blood for tumor cells. *JNCI* **19**: 1-11, 1957.
- 佐藤春郎: 癌転移—腹水腫瘍の実験病理学的研究から. *日病誌 (J. soc. path. Jap)* **56**: 9-36, 1967.
- Suemasu K: Inhibitive effect of heparin and dextran sulfate on experimental pulmonary metastasis. *Gann* **61**: 125-130, 1970.
- Takahashi T: Influence of vascular permeability on blood borne metastases. *Gann* **64**: 1-5, 1973.
- 滝田 仁: 腸癌細胞の静脈内移植による実験的転移形成. *吉田肉腫および腹水肝癌による研究*. *東北医誌* **65**: 384-401, 1962.
- 田中健蔵: 癌と凝固線溶. *癌の臨床* **26**: 117-122, 1980.
- 宇津慶三: マイトマイシンの化学構造と生物活性.

- ァフルマシア 1: 560-564, 1965.
- 34) Walker A: Promotion of metastases of C3H mouse mammary carcinoma by local hyperthermia. Br J Cancer **38**: 561, 1978.
- 35) Witners HR: Influence of preirradiation of lung on development of artificial pulmonary metastases of fibrosarcoma in mice. Cancer Res **33**: 1931-1936, 1973.
- 36) Wood S: Experimental studies of the intravascular dissemination of ascites V₂ carcinoma cells in the rabbit with special reference to fibrinogen and fibrinolytic agents. Bull Science Acad Med Soc **20**: 92-121, 1964.
- 37) Sakurai Y.: In vitro culture of yoshida sarcoma cells: methods for determining acquired resistance to drugs. in Ascites tumors yoshida sarcoma and ascites hepatoma(s). edited by Yoshida T., and Sato H. National Cancer Institute Monograph **16**: 207~289, 1964.